Lane Medical Library

Die spektrophotometrische Farbstoffanalyse des Blutserums mit besonderer Berücksichtigung des Bilirubin- und Carotinspektrums

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Thüringischen Landesuniversität Jena

vorgelegt von

Helga Toop

Jena 1934

Universitäts-Buchdruckerei G. Neuenhahn, G.m.b.H., Jena

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Thüringischen Landesuniversität Jena.

Gutachter: Privatdozent Dr. Heilmeyer.

Jena, den 28. Juli 1933.

gez. Prof. Dr. Gräper,
dz. Dekan.

Sonderdruck
aus „Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin“ Bd. 80, 1932.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik Jena [Direktor: Prof. Dr. *W. H. Veil*].)

Die spektrophotometrische Farbstoffanalyse des Blutserums mit besonderer Berücksichtigung des Bilirubin- und Carotinspektrums.

Von

Helga Toop.

Mit 13 Textabbildungen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153320_0156

Einleitung.

Trotz zahlreicher Arbeiten, die in den letzten Jahren über Serumfarbstoffe erschienen sind, wurde die physikalische Untersuchung der Serumfarbe bisher wenig gepflegt. *Karl Vierordt*[1], der Begründer der Spektrophotometrie, hat dazu den ersten Weg gewiesen. Er hat bereits in seiner grundlegenden Arbeit eine quantitative Absorptionskurve des normalen Menschenserums aufgestellt. Er fand dabei, daß die Lichtabsorption vom roten bis zum violetten Ende des Spektrums stark zunahm. Über die Natur des dieser Erscheinung zugrunde liegenden Serumfarbstoffes konnte er aus seinen Messungen noch nichts aussagen. Aus der Verschiedenheit der Extinktionskoeffizientenverhältnisse bei verschiedenen Seren schloß er nur, daß es sich im Normalserum nicht nur um einen einzigen Farbstoff handeln könne. Über ein halbes Jahrhundert blieb die Spektrophotometrie der Serumfarbe unbeachtet. Erst 1926 haben *Sheard, Baldes, Mann* und *Bollmann*[2] in Amerika die Spektrophotometrie zur Bestimmung des Bilirubins in Galle und Blutserum herangezogen. 1927 haben *Magath* und *Sheard*[3] spektrophotometrische Analysen des Blutserums unter normalen und pathologischen Bedingungen durchgeführt. Mit dem Spektrophotometer von *Keuffel* und *Esser* bestimmten sie die Lichtdurchlässigkeit verschiedener Blutsera in zahlreichen Spektralabschnitten von 700—430 $\mu\mu$. Die Ergebnisse trugen sie auf Kurven ein, welche als Abszisse die Wellenlänge, als Ordinate die prozentuale Lichtdurchlässigkeit hatten. Auf Grund des Kurvenverlaufs schlossen sie, daß der Hauptfarbstoff des normalen und pathologischen Serums Bilirubin sei. Daneben finden sie noch eine Ausbiegung der Kurve bei 620—640 $\mu\mu$, die sie auf Hämatin beziehen. Auf Grund ihrer analytischen Ergebnisse kommen die Autoren zu der Ansicht, daß die Spektrophotometrie des Blutserums eine ausgezeichnete Methode zur quantitativen Bestimmung des Bilirubins sei. Wichtige experimentelle Untersuchungen über die Entstehung des Ikterus sind darauf gegründet.

Unabhängig von diesen amerikanischen Arbeiten haben *Heilmeyer* und *Wappler*[4] eine vereinfachte spektrophotometrische Methode zur Untersuchung des Blutserums für klinische Zwecke in Form der Absorptionsmessung in drei Spektral-

abschnitten mit dem *Zeiß*schen Stufenphotometer angegeben. Sie konnten nachweisen, daß die Lichtabsorption des Blutserums im roten und grünen Spektralabschnitt sehr starken Schwankungen unterliegt, die besonders durch geringe Hämolyse und Trübungen des Serums (Lipämie) hervorgerufen werden. Sie konnten ferner nachweisen, daß die nach intensiver Beleuchtung (Sonne oder Quecksilberlicht) beobachteten Veränderungen der Lichtabsorption des Blutserums völlig denen gleichen, die eine verdünnte Bilirubinlösung durch dieselben Einwirkungen erfährt, eine Beobachtung, die auch schon von den amerikanischen Autoren gemacht wurde. Als klinisches Maß für die Farbkonzentration des Serums schlugen *Heilmeyer* und *Wappler* den Extinktionskoeffizienten (ε_{μ}) für den blauen Spektralabschnitt (430—480 $\mu\mu$) vor, der durch Anwendung eines entsprechenden Blaufilters mit dem *Zeiß*schen Stufenphotometer in sehr einfacher Weise gemessen werden kann. Auf eine direkte Berechnung des Bilirubingehalts wurde verzichtet, da neben dem Bilirubin zweifellos noch andere Farbstoffe im Blutserum vorkommen.

In jüngster Zeit ist die Spektrophotometrie des Blutserums zum Zwecke der quantitativen Bilirubinbestimmung auch von *Pius Müller*[5] aufgegriffen worden.

Methodik.

Zu den spektrophotometrischen Messungen diente ein Spektralphotometer nach *König* und *Martens*, das der Klinik von der Notgemeinschaft deutscher Wissenschaft zur Verfügung gestellt worden ist, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei. Die Justierung und Eichung des Instrumentes wurde von *Heilmeyer* 1929 vorgenommen. Eine Nachkontrolle der Eichkurve zwei Jahre später ergab eine geringe Abweichung um 10 Trommelteile. Als Lichtquelle diente eine *Zeiß*sche Punktlichtlampe, die so aufgestellt war, daß das Bild der glühenden Wolframscheibe auf die mattierte Glasscheibe der Eintrittsöffnung des großen Beleuchtungsapparates fiel. Der Eintrittsspalt des Spektrophotometers war gewöhnlich 0,1 mm weit, nur bei Messungen im äußersten Blau wurde der Spalt weiter geöffnet. Der Okularspalt war so weit auf, daß im Rot ein etwa 5 $\mu\mu$, im Grün etwa 3 $\mu\mu$ großer Spektralausschnitt herausgeblendet wurde. Im Blau wurde der Okularspalt entsprechend der größeren Dispersion weiter genommen, so daß der herausgeblendete Spektralabschnitt etwa 3—5 $\mu\mu$ umfaßte. Außerdem wurde bei Messungen im Blau durch Änderung des Widerstandes die Strahlungsintensität der Lichtquelle gesteigert. Die Ablesungen wurden in einem völlig verdunkelten Zimmer vorgenommen. Das Streulicht der Lichtquelle wurde so gut als möglich abgeschirmt. Die Skalaablesungen wurden mit Hilfe einer Taschenlampe vorgenommen.

Da die Fehlergröße der Bestimmungen eine Funktion des absoluten Wertes der Extinktion darstellt, wurde darnach getrachtet, eine möglichst große Extinktion zu erreichen. Dies geschah dadurch, daß in den weniger stark absorbierenden Spektralabschnitten (rot und grün) mit viel größeren Schichtdicken gearbeitet wurde als im Blau. Zur Absorptionsmessung im Rot und Grün verwandten wir gewöhnlich eine Schichtdicke von 20—50 mm, im Blau eine solche von 5—10 mm, je nach der Größe der Absorption. Sämtliche Werte für die Extinktion wurden auf 1 cm Schichtdicke umgerechnet. Im roten und grünen Spektralgebiet wurden die Absorptionsmessungen meist von 20 zu 20 $\mu\mu$, von Wellenlänge 500 $\mu\mu$ an meist von 10 zu 10 $\mu\mu$ vorgenommen, so daß insgesamt 16—20 Spektralstellen gemessen wurden. In besonderen Fällen wurden auch dazwischenliegende Punkte gemessen. Auf diese Weise gelang es uns, das Absorptionsspektrum des Blutserums quantitativ von Wellenlänge 700—420 $\mu\mu$ aufzunehmen. Die graphische Darstellung des quantitativen Absorptionsspektrums wurde in Form einer sog. *typischen Farbkurve* vorgenommen, welche den Logarithmus des Extinktionskoeffizienten zur Ordinate, die Wellenlänge zur Abszisse hat. Nur eine solche Form der Darstellung liefert

für identische Farbstoffe formgleiche Kurven, welche von Konzentration und Schichtdicke unabhängig sind. (*L. Heilmeyer*[6] in Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.)

I. Die normale Serumfarbkurve.

a) Beschreibung.

Abb. 1 zeigt die typischen Farbkurven von fünf normalen Blutseren (Kurve I—V). Obwohl die Kurven im einzelnen verschieden verlaufen,

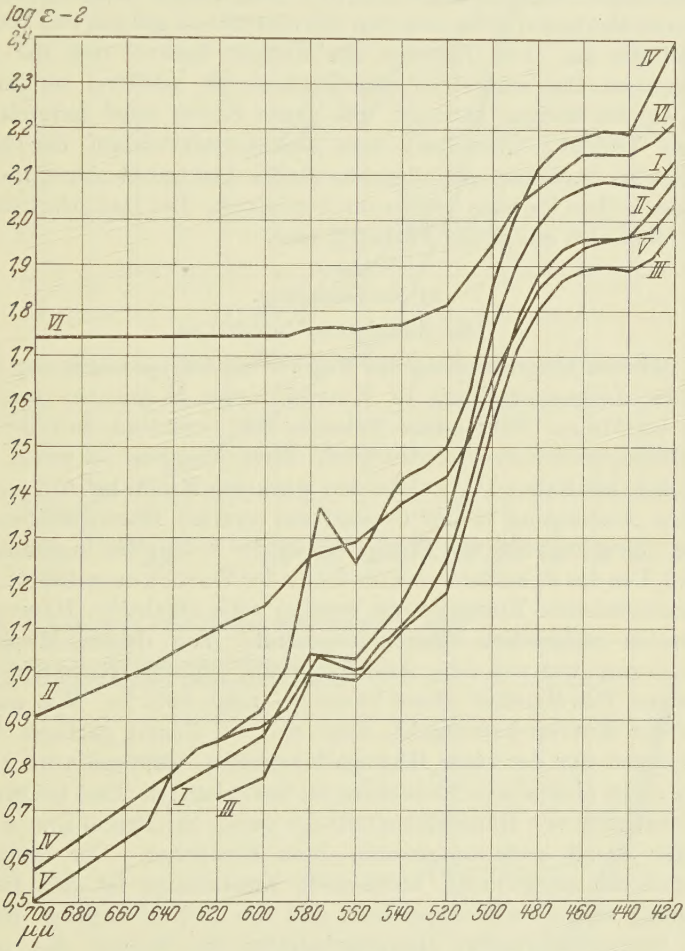

Abb. 1. I—V typische Farbkurven von Normalseren; VI typische Farbkurve eines lipämischen Serums.

so zeigen sich trotzdem übereinstimmende Merkmale. Zunächst nimmt die Lichtabsorption vom roten zum blauen Ende stark zu. Die Zunahme ist besonders stark im Gebiet von 520—470 $\mu\mu$. Von diesem Punkt

an wird die Zunahme der Lichtabsorption sehr viel geringer. Die Kurven biegen zur Horizontalen um, bei einigen nimmt die Lichtauslöschung von 450 $\mu\mu$ an sogar etwas ab, um dann gegen 420 $\mu\mu$ wieder zuzunehmen. Außerdem zeigen sämtliche Kurven in der Gegend von 580 $\mu\mu$ einen mehr oder weniger starken Knick. Den stärksten Knick zeigt Kurve IV, er ist hier zu einem ausgesprochenen Gipfel ausgebildet. Die erste Strecke des Kurvenverlaufes von 700—600 $\mu\mu$ ist bei Kurve II und IV eine gradlinige, dagegen zeigt Kurve V eine leichte Ausbiegung nach oben, deren Maximum etwa zwischen 640 und 620 $\mu\mu$ gelegen ist. Kurve II fällt dadurch aus dem Rahmen der übrigen heraus, daß die Lichtabsorption im Rot und Grün eine stärkere ist, während sie im Blau ebenso wie die übrigen verläuft. Die ganze Kurve zeigt dadurch einen flacheren Verlauf. Überblickt man den Gesamtverlauf der Serumfarbkurve, so imponiert vor allem die starke Lichtauslöschung im Blau, welche den gelben Farbton des Serums hervorruft. Der Hauptfarbstoff des Serums muß also ein gelber Farbstoff sein.

b) Kurvenanalyse.

1. Die Ausbiegung bei 580 $\mu\mu$.

Zur näheren Identifizierung des Knickes bei 580 $\mu\mu$ wurde der Gipfelpunkt der Lichtauslöschung in Kurve IV und V genauer bestimmt. Er liegt bei 576 $\mu\mu$. Schon diese Tatsache läßt vermuten, daß der Knick durch Hämoglobin hervorgerufen wird. Diese Annahme ist um so wahrscheinlicher, als Kurve IV, welche den stärksten Knick bei 576 $\mu\mu$ zeigt, auch eine Ausbiegung in der Gegend des zweiten Hämoglobinstreifens aufweist. Es erhebt sich die Frage: Wo ist der 2. Streifen in den übrigen Kurven? Um das zu erklären, wurde folgender Versuch ausgeführt: Einem fast hämolysefreien Normalserum wurden soda-alkalische Hämoglobinlösungen in steigenden Mengen zugesetzt. Von diesen Mischungen wurden ebenso wie von dem Ausgangsserum typische Farbkurven aufgenommen. Das Resultat dieses Versuches zeigt Abb. 2a. Wie aus dem Verlauf der Kurven hervorgeht, zeigt sich bei Zusatz geringer Hämoglobinmengen nur der erste Hämoglobinstreifen, während vom zweiten Streifen nicht einmal eine Andeutung zu bemerken ist. Erst bei größeren Konzentrationen von Hämoglobin tritt der zweite Streifen in Erscheinung, und zwar zuerst andeutungsweise, dann deutlicher. Der Grund für diese zunächst merkwürdig berührende Erscheinung ist, wie folgende Berechnung zeigt, darin zu suchen, daß die Lichtabsorption des dem Serum zugrundeliegenden Hauptfarbstoffes im Bereich des zweiten Hämoglobinstreifens sehr stark zunimmt und ihn sozusagen „verschluckt". Den Beweis dafür erbringt folgende Berechnung:

Zu den Extinktionskoeffizienten des annähernd hämolysefreien Serums der Kurve I werden die Extinktionskoeffizienten der zugefügten Hämoglobinlösungen unter Berücksichtigung des Mischungsverhältnisses addiert. Die Summe wird

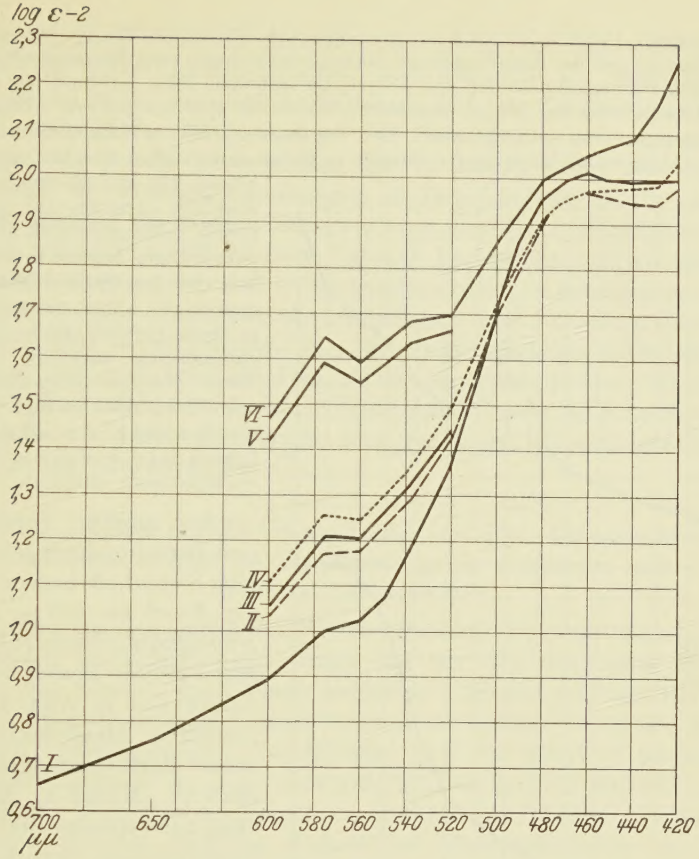

Abb. 2a. I Farbkurve eines nahezu hämoglobinfreien Normalserums; II—VI Farbkurven desselben Serums wie I mit Zusatz steigender Mengen einer soda-alkalischen Hämoglobinlösung.

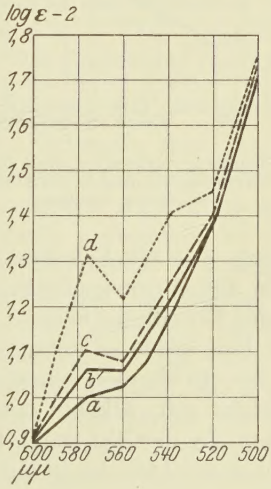

Abb. 2b. Kurve a Ausgangsserum wie in Kurve I der Abb. 2a; Kurve b—d rechnerisch konstruierte Kurven (aus den Daten der Kurve a und den bekannten Extinktionen einer wäßrigen Hämoglobinlösung). Mischungen mit steigender Hämoglobinkonzentration.

logarithmiert. Die errechneten Kurven sind in Abb. 2b dargestellt. Sie lassen deutlich erkennen, daß der Zusatz geringer Hämoglobinmengen zum Ausgangsserum nur den ersten Hämoglobinstreifen bei 576 $\mu\mu$ hervortreten läßt, während der zweite Hämoglobinstreifen bei 540 $\mu\mu$ vollständig durch die steil ansteigende Absorption des Ausgangsserums verdeckt wird. Erst bei Zusatz größerer Hämoglobinmengen (Kurve d) kommt auch der zweite Streifen in Form eines flachen Knickes zum Vorschein. Die errechneten Kurven sind den experimentell gewonnenen außerordentlich ähnlich, jedoch liegen letztere in dem Gebiet zwischen 600 und 500 $\mu\mu$ im ganzen viel höher, um so höher, je mehr soda-alkalische Hämoglobinlösung zugefügt wurde. Diese Absorptionszunahme ist durch Trübungen bedingt, welche bei Zufügung der alkalischen Lösung durch Ausfall von Serumeiweißkörpern entsteht.

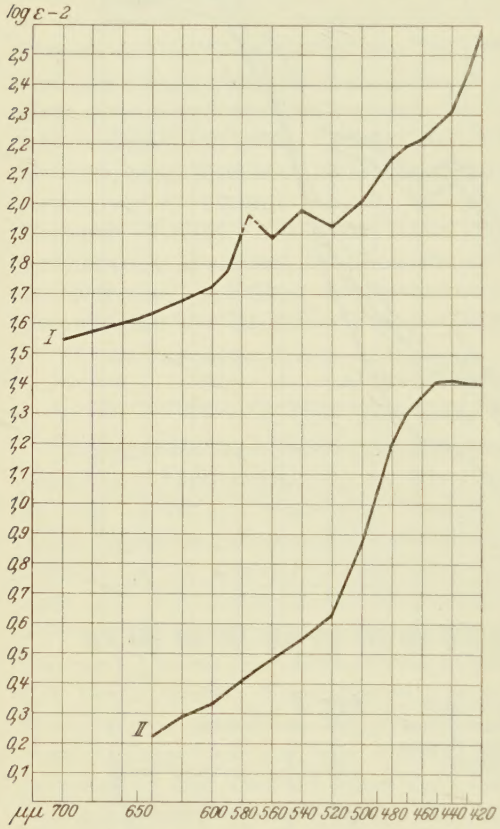

Abb. 3. I typische Farbkurve eines hämolytischen Serums; II typische Farbkurve des Alkoholextraktes desselben Serums.

Aus unseren Versuchen und Berechnungen geht also mit Sicherheit hervor, daß der *Knick bei 576 $\mu\mu$ durch Hämoglobin hervorgerufen* ist. Ein weiterer Beweis ist die Kurve des in Abb. 3 dargestellten Alkoholextraktes eines stark hämolytischen Serums. Kurve I, Abb. 3, zeigt das typische Bild eines hämolytischen Serums mit ausgeprägten Gipfeln bei 576 $\mu\mu$ (die nach oben verlängerten, gestrichelt angedeuteten auf- und absteigenden Schenkel des Knickes zwischen 580 und 570 $\mu\mu$ schneiden sich gerade bei 576 $\mu\mu$) und 540 $\mu\mu$. Zur Herstellung des Alkoholextraktes wurden zwei Teile 96%iger Alkohol mit einem Teil Serum gemischt. Daraus ergibt sich ein 64%iger Alkohol, in dem das Eiweiß des Serums vollständig ausfällt. Um eine klare überstehende Flüssigkeit zu erhalten, muß die Alkohol-Serummischung mindestens 30—40 Minuten scharf zentrifugiert werden. Bei Ausfällung des Hämoglobins mit Alkohol müssen die beiden Hämoglobinstreifen verschwinden. In der Tat zeigt Kurve II, die das Absorptionsspektrum des Alkoholextraktes des in Kurve I dargestellten hämolytischen Serums

wiedergibt, nicht mehr die geringste Andeutung von Hämoglobin. Die Kurve hat einen kontinuierlichen von 640—520 $\mu\mu$ flacheren, von 520—470 $\mu\mu$ steiler ansteigenden Verlauf. Mit der Erkenntnis, daß der Knick bei 576 $\mu\mu$ durch Spuren von Hämoglobin hervorgerufen ist, kommen wir zu der Feststellung, daß in jedem Serum, sei das Blut auch noch so vorsichtig entnommen, in Paraffingläser gefüllt und das Serum spontan oder durch Zentrifugieren gewonnen, Hämoglobin vorkommt. Schon *Vierordt*[1] hat diese Tatsache beobachtet, und wir schließen uns seiner Meinung an, daß es einwandfrei nicht zu beweisen sein wird, ob diese geringe Hämolyse eine natürliche oder künstlich durch die Blutentnahme hervorgerufene ist. Die spektrophotometrische Methode ist eben eine viel empfindlichere als die spektroskopische. Wir haben nur bei Kurve IV, Abb. 1, einen deutlichen Streifen bei etwa 580 $\mu\mu$ im Spektroskop gesehen. Die übrigen Sera erschienen bei spektroskopischer Betrachtung hämoglobinfrei.

2. Die Analyse des Kurvenabschnittes von 520—440 $\mu\mu$ und das Absorptionsspektrum des Bilirubins im Blutserum und ähnlichen Lösungsmitteln.

Wenden wir uns jetzt jenem Teil der Farbkurve zu, der den charakteristischsten Verlaufsabschnitt bildet und der den sichtbaren Farbeindruck des Serums maßgebend bestimmt. Durch welchen Farbstoff ist der Absorptionsverlauf dieses Abschnittes bedingt? Seit den grundlegenden Untersuchungen von *Hijmans van den Bergh*[7, 8] wissen wir, daß Gallenfarbstoff in nicht unerheblichen Mengen im Menschenserum vorkommt. Ferner haben *Magath, Sheard, Baldes, Mann* und *Bollmann*[2] zu zeigen versucht, daß der Verlauf der Absorptionskurve von Blutseren mit dem Verlauf der Absorptionskurve des Bilirubins übereinstimmt. Die amerikanischen Autoren finden diese Übereinstimmung an Hand von Kurven, welche als Ordinate die prozentual durchgehende Lichtintensität $\left(\frac{I}{I_0}\right)$ haben. Derartige Kurven sind jedoch für den genauen Nachweis der Identität zweier Farbstoffe sehr ungeeignet. Denn 1. ist die Form dieser Kurven außerordentlich von der Konzentration und Schichtdicke, in der der Farbstoff gemessen wird, abhängig. Da aber die Farbstoffkonzentration des Serums unbekannt ist, ist ein exakter Vergleich kaum möglich. 2. Kommen kleine Änderungen der Lichtabsorption in dem Teil der Kurve, in dem die durchgehenden Lichtintensitäten nahe bei 0 liegen, nicht zum Ausdruck, obwohl das Auge nach dem *Weber*schen Gesetz der Sinnesempfindungen noch Unterschiede von 1.00 und 1.02% sehr gut feststellen kann, eine genügend starke Lichtquelle vorausgesetzt. Nun liegt aber gerade der für das Bilirubin charakteristische Teil der Absorptionskurve in einem solchen Gebiet maximaler Absorption. Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn

den amerikanischen Autoren der charakteristische Verlauf der Absorptionskurve des Bilirubins im Bereich von 500—420 $\mu\mu$ völlig entgangen ist. *Heilmeyer*[9] hat zuerst gezeigt, daß das Absorptionsspektrum des Bilirubins in Chloroform und Alkohol keine einfache Endabsorption darstellt, sondern daß das Bilirubin ein deutliches Absorptionsmaximum zwischen 440 und 460 $\mu\mu$ besitzt (Kurve I, Abb. 4). Von 440 $\mu\mu$ an fällt die Absorptionskurve stetig gegen das ultraviolette Gebiet ab (bestätigt durch *P. Müller* und *L. Engel*[18]). Das in Alkalien gelöste Bilirubin zeigt ein solches Absorptionsmaximum bei 450 $\mu\mu$ nicht, sondern die Kurve steigt bis 420 $\mu\mu$ kontinuierlich an. Der Anstieg ist zum Schluß etwas geringer. Nach den Untersuchungen von *P. Müller* und *L. Engel*[19] liegt bei 420 $\mu\mu$ das Maximum.

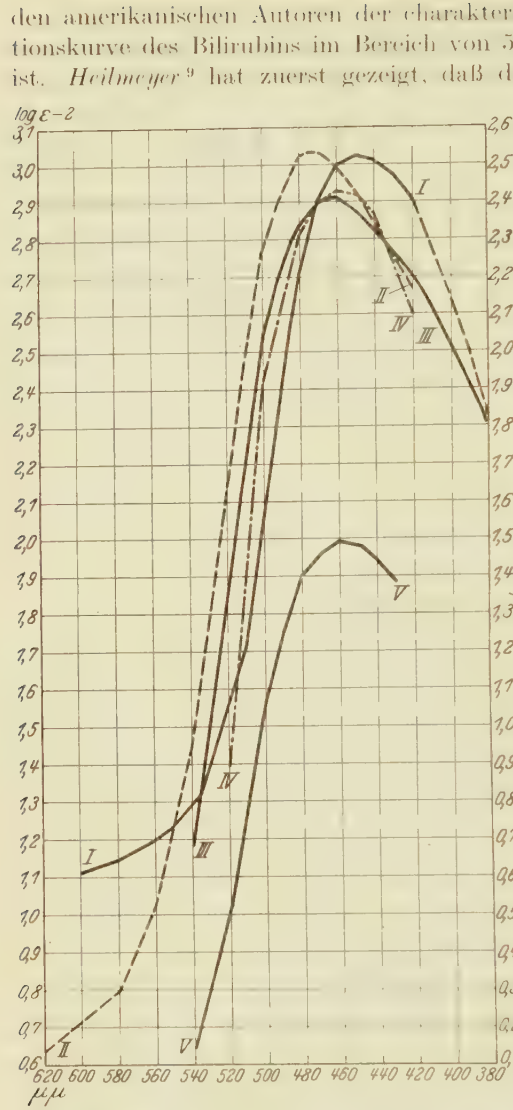

Abb. 4. Typische Farbkurven des Bilirubins. I in Chloroform; II in Pferdeserum; III in Menschenserum; IV natives Serumbilirubin durch Hämolyse in vivo mit Aqua destillata-Injektion erzeugt; V in Menschenserum durch Injektion von Bilirubin „Homburg" in vivo.

Um den Ausdruck des *Bilirubins* in der Serumkurve zu finden, war es notwendig, sich über den Verlauf der Absorptionskurve des Bilirubins in „Lösungsmittel Serum" Klarheit zu verschaffen.

Wir gingen dazu folgendermaßen vor: Eine bestimmt abgewogene Menge von reinem Bilirubin Homburg, etwa 10 mg, wurde in 10 ccm 5%iger Sodalösung gelöst. Davon wurden 0,2 ccm zu 5 ccm Serum hinzugefügt. Um die Eigenfarbe und Trübung des mit Bilirubin versetzten Serums auszuschalten, wurde als Vergleichslösung dasselbe Serum + 0,2 ccm 5%iger Sodalösung gegengeschaltet, so daß man als Ergebnis die Absorption des im Serum gelösten Bilirubins erhalten mußte.

Das überraschende *Ergebnis* zeigt Abb. 4, Kurve II. Das im Pferdeserum gefundene Absorptionsspektrum des Bilirubins deckt sich weitgehend mit dem Chloroformspektrum des Bilirubins (Kurve I), nur ist die ganze Kurve um 20 $\mu\mu$ nach links verschoben. Das Absorptionsmaximum liegt dementsprechend im Pferdeserum bei 470 $\mu\mu$, in Chloroform bei 450 $\mu\mu$. Derselbe Versuch wurde mit Menschenserum vorgenommen, und hier zeigte sich nun, daß die Absorptionskurve des Bilirubins im Menschenserum zwischen der des Pferdeserums und der des Chloroforms liegt (Kurve III). Das Maximum liegt bei 460 $\mu\mu$. Gleichzeitig wurden die Absorptionsverhältnisse (A) ermittelt, die folgende Werte ergaben: Im Pferdeserum $A_{470} = 0{,}0000125$, im Menschenserum $A_{460} = 0{,}0000152$. Bilirubin in Chloroform gelöst ergibt $A_{450} = 0{,}0000106$, in Alkohol $A_{450} = 0{,}0000119$.

Wie man sieht, weichen die Werte der Absorptionsverhältnisse in Serum nicht sehr erheblich von den in Chloroform und Alkohol gefundenen Werten ab; daß die Verhältnisse im Serum höher liegen, hängt wohl damit zusammen, daß das Bilirubin zunächst in Soda gelöst werden muß. In alkalischen Lösungen ist aber Bilirubin nicht haltbar, und die Absorption nimmt sehr rasch ab.

Man könnte gegen unser Vorgehen noch einwenden, daß das künstlich im Serum gelöste Bilirubin eine andere Kurve ergibt als das native Serumbilirubin. Um diese Frage klarzustellen, machten wir folgenden Versuch: Wir erzeugten bei einem gesunden Menschen künstlich Hämolyse im strömenden Blut durch Injektion von 40 ccm destillierten Wassers und verglichen das Serum des vor Injektion abgenommenen Blutes mit dem Serum des eine Stunde nach Injektion abgenommenen Blutes. Auf diese Weise gewannen wir das Bild des natürlich entstandenen Serumbilirubins, wie es Kurve IV, Abb. 4, wiedergibt. Die Kurve zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die des künstlich mit Bilirubin versetzten Menschenserums, ihr Maximum liegt bei 460 $\mu\mu$ *.

In einem weiteren Versuch wurde einem gesunden Menschen Bilirubin „Homburg" injiziert und die Messung der Kurve wie im vorigen Versuch vorgenommen. Es zeigt sich dabei annähernd dasselbe Bild wie beim nativen Serumbilirubin und beim künstlich im Menschenserum gelösten Bilirubin, wie der Verlauf von Kurve V darstellt.

Betrachtet man den Verlauf der Bilirubinfarbkurven im Serum, so erheben sich unwillkürlich die Fragen: Woher kommen diese Verschiedenheiten der Lichtabsorption des Bilirubins, im Serum gegenüber

* Die kleinen Unterschiede können nicht gewertet werden, da ja geringe Differenzen in den übrigen Serumfarbstoffen infolge der Aqua dest.-Injektion immerhin möglich erscheinen. Das kann jedoch an der Tatsache nichts ändern, daß die Farbstoffvermehrung nach Aqua dest. durch einen Farbstoff hervorgerufen ist, der sich im Prinzip völlig mit dem im Serum gelösten Bilirubin in bezug auf sein Spektrum deckt.

Chloroform und alkalischen Lösungen? Welcher Faktor bestimmt maßgebend das Absorptionsspektrum des Bilirubins im Serum?

Im folgenden wird eine Reihe von Versuchen geschildert, die der Beantwortung dieser Fragen dienen sollen. In diesen Versuchen setzten wir Bilirubin verschiedenen Lösungsmitteln zu, und zwar in der gleichen Weise wie in dem oben beschriebenen Versuch mit Pferde- und Menschenserum: Es wurde eine abgewogene Menge, etwa 10 mg, in 10 ccm 5% Sodalösung gelöst und 0,2 ccm dieser Lösung der zu untersuchenden Flüssigkeit zugesetzt. Das Bilirubin wurde deshalb vor jedem Versuch in Sodalösung aufgelöst, weil es sich nicht direkt und nicht immer vollständig in jedem beliebigen Lösungsmittel löst. Nur dadurch hatten wir die Kontrolle über die Menge des zugesetzten Bilirubins in der Hand. Die Messung wurde unmittelbar nach Herstellung der Lösung vorgenommen, um Änderungen des Bilirubinspektrums durch den geringen Zusatz von Alkalien möglichst zu vermeiden. Die zu untersuchende Flüssigkeit entsprach in ihrer Farbsättigung ungefähr normalem Blutserum. Als Vergleichslösung wurde immer das betreffende Lösungsmittel gegengeschaltet, um das Bild der reinen Bilirubinkurve zu erhalten.

Bei Erwägung der möglichen Ursachen für die Verschiedenheit der Absorption des Bilirubins liegt es zunächst nahe, an den Einfluß der H-Ionenkonzentration zu denken, die ja den Absorptionsverlauf von Farbstoffen fast durchweg stark beeinflußt. Um diesen Einfluß zu prüfen, stellten wir eine Phosphatpufferlösung so her, daß sie mit 0,2 ccm Bilirubinsoda versetzt, dasselbe p_H wie Serum hatte, also etwa zwischen 7,2 und 7,4.

Abb. 5, Kurve Ia, zeigt das Absorptionsspektrum des Bilirubins in Phosphatpufferlösung. Die Kurve verläuft im roten Spektralgebiet nahezu horizontal und steigt dann gegen das blaue Ende zuerst steil, von 450 $\mu\mu$ etwas flacher an, ähnelt somit in ihrem Verlauf dem alkalischen Spektrum des Bilirubins (in 5% Sodalösung).

Um über den weiteren Verlauf der Absorptionskurve ab 420 $\mu\mu$ gegen das Ultraviolett zu Aufschluß zu erhalten, wurde das Spektrum dieser Bilirubin-Phosphatpufferlösung mit dem Spektrographen in der Anordnung nach *Schaiba* [10] aufgenommen* und die logarithmisch abgestuften Spektrogramme quantitativ ausgewertet. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt Kurve Ib. Da der gestrichelte Teil der Kurve durch die etwas geringere Genauigkeit der Methode in diesem Spektralabschnitt unsicher ist, läßt sich das Absorptionsmaximum nicht ganz genau festlegen. Wichtig ist aber die Feststellung, daß überhaupt ein Maximum vorhanden ist, was der Abfall der Kurve im ultravioletten Gebiet, in dem wieder mit größerer Genauigkeit gemessen werden kann, beweist. Das Maximum liegt etwa bei 425 $\mu\mu$. Gleichzeitig wurde zur

* Der Firma *Carl Zeiß* sei für das Entgegenkommen hierzu bestens gedankt.

Kontrolle auch das Spektrum von Bilirubin im Menschenserum mit dem Spektrographen aufgenommen. Das Ergebnis unserer oben erwähnten

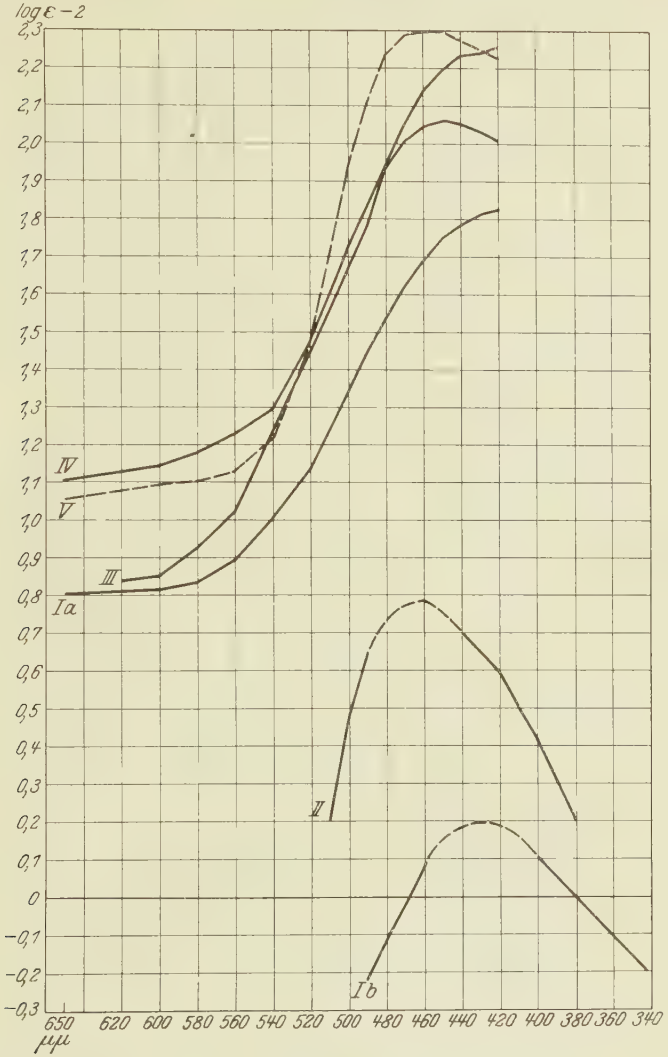

Abb. 5. Typische Farbkurven des Bilirubins. Ia in Phosphatpufferlösung von pH 7,4; Ib in Phosphatpufferlösung von pH 7,4 mit dem Spektrographen nach *Scheibe* aufgenommen; II in Menschenserum mit dem Spektrographen nach *Scheibe* aufgenommen; III in Ringerlösung; IV in 4 Teilen Phosphatpufferlösung wie Ia + 1 Teil Serum; V in Serumdialysat.

Untersuchung wurde vollauf bestätigt, wie Kurve II, Abb. 5, zeigt. Beim Vergleich der beiden eben genannten Kurven sieht man, wie das Absorptionsmaximum in der alkalischen Phosphatlösung, trotz gleicher

H-Ionenkonzentration im Serum und der Pufferlösung, nach rechts verschoben ist. Dies läßt erkennen, daß die H-Ionenkonzentration das optische Verhalten des Bilirubins im Serum nicht erklärt.

Es ist nun die Frage in Betracht zu ziehen, ob die Gegenwart von Salzen und ihre Zusammensetzung das Absorptionsspektrum des Bilirubins im Serum bedingt. Wir nahmen daher das Spektrum des Bilirubins in Ringerlösung auf. Das Ergebnis zeigt Kurve III. Die Kurve zeigt, wie Kurve Ia, einen bis 420 $\mu\mu$ kontinuierlich ansteigenden Verlauf und beweist hiermit zweierlei: 1. daß die Gegenwart von Salzen für die Erklärung des Bilirubinspektrums nicht herangezogen werden kann, da die Bilirubin-Ringerlösung trotz gleicher Art und Konzentration von Salzen wie das Serum ein anderes Absorptionsspektrum zeigt als das Serumbilirubin, und 2. bestätigt sie die vorhin aufgestellte Behauptung, daß die H-Ionenkonzentration das Absorptionsspektrum des Bilirubin im Serum nicht erklärt, denn auch Ringerlösung besitzt annähernd dieselbe H-Ionenkonzentration wie Serum.

Um zu prüfen, welchen Einfluß ein geringer Zusatz von Serum auf das Bilirubinspektrum in einem der verwendeten Lösungsmittel hat, wurde der Phosphatpufferlösung soviel Serum zugesetzt, daß ein fünffach verdünntes Serum entstand. Wie man aus Abb. 5, Kurve IV, sieht, verändert sich das Bild sofort dahin, daß eine der Serumbilirubinkurve sehr ähnliche Kurve entsteht mit einem Absorptionsmaximum bei 450 $\mu\mu$. Warum das Absorptionsmaximum nicht bei 460 $\mu\mu$ liegt, wie bei Kurve IV, Abb. 4, läßt sich schwer sagen; vielleicht ist die Pufferlösung daran schuld. Jedenfalls ist es wichtig, festzustellen, daß selbst verdünntes Serum als Lösungsmittel eine der typischen Serum-Bilirubinkurve sehr ähnliche Kurve hervorzubringen vermag, während Lösungen von gleicher H-Ionenkonzentration und gleichem Ionenmilieu ganz andere Absorptionsspektren zeigen.

Es liegt jetzt nahe, daran zu denken, daß der Eiweißgehalt des Serums von maßgebendem Einfluß auf das Bilirubinspektrum ist. Deshalb wurde das Dialysat eines Blutserums hergestellt, das außer dem Eiweiß alle im Serum gelösten dialysablen Stoffe enthielt. Die Kochprobe bewies, daß das Dialysat wirklich eiweißfrei war. Diesem Dialysat wurde in der üblichen Weise Bilirubin zugesetzt. Wenn die Eiweißkörper etwa durch Bindungen an den Farbstoff das Spektrum erzeugten, müßte das Bild der Bilirubin-Dialysatkurve von der Bilirubin-Serumkurve wesentlich abweichen. Wie aber Kurve V, Abb. 5, zeigt, kann von einer wesentlichen Abweichung nicht die Rede sein; die Kurve steigt von 540 $\mu\mu$ steil an, besitzt ein Absorptionsmaximum zwischen 460 und 450 $\mu\mu$ und fällt gegen das violette Ende des Spektrums wieder ab. Die Kurve entspricht zwar nicht ganz der Serumkurve, Anstieg und Abfall sind nicht so steil, hat aber mit ihr große Ähnlichkeit und erlaubt den

Schluß, daß das Serumeiweiß für das Bilirubinspektrum im Serum jedenfalls nicht allein verantwortlich zu machen ist.

Es ist also bisher nicht gelungen, einwandfrei festzustellen, welcher Bestandteil des Serums für das Bilirubinspektrum ausschlaggebend ist. Möglicherweise ist das Zusammenspiel verschiedener Bestandteile oder ein bisher noch unbekannter Stoff im Serum von Einfluß.

Der Angabe von *P. Müller* und *L. Engel*[5], daß das Absorptionsspektrum des Bilirubins in Phosphatpufferlösung von gleichem p_H wie das Blutserum mit dem Bilirubin-Serumspektrum übereinstimme, können wir nicht beipflichten. Deshalb ist auch der Schluß, daß das Bilirubin im Serum als Natrium-Bilirubinat gelöst sei, nicht gerechtfertigt.

Im Zusammenhang mit den eben besprochenen Versuchen wurden noch verschiedene Lösungsmittel mit Bilirubin versetzt, um die Abhängigkeit des Spektrums vom Lösungsmittel zu studieren. Kurve I, Abb. 6, zeigt das Bild des Spektrums von Bilirubin, das in zehnfach mit Wasser verdünntem Serum gelöst ist. Die Kurve zeigt einen steil ansteigenden Verlauf bis zu einem Absorptionsmaximum zwischen 460 und 450 $\mu\mu$ und fällt dann etwas weniger steil bis zu 420 $\mu\mu$ wieder ab, stimmt somit mit der Bilirubin-Serumkurve bis auf den letzten weniger steil abfallenden Teil weitgehend überein. Selbst bei dieser großen Verdünnung macht sich der Einfluß des Serums noch geltend. Fügt man dagegen Soda-Bilirubin in derselben Verdünnung zu reinem Aqua dest., so tritt ein wohlumschriebenes Absorptionsmaximum nicht mehr in Erscheinung, wie Kurve II, Abb. 6, zeigt. Die Kurve steigt im blauen Spektralgebiet steil an, verläuft dann von 450 $\mu\mu$ an sehr flach, ein Abfall ist am Ende des sichtbaren Spektrums nicht zu bemerken. Behandelt man diese Bilirubin-Wasserlösung wie die Alkoholextrakte von Sera, indem man einen Teil mit zwei Teilen Alkohol mischt, so ergibt sich daraus eine Kurve, die stark an die Bilirubin-Alkoholkurve erinnert, wie Kurve III, Abb. 6, zeigt. Es wird ein richtiger Bogen im blauen Spektralgebiet mit dem Absorptionsmaximum bei 450 $\mu\mu$ gebildet, im ganzen ist der Bogen aber flacher als bei der Bilirubin-Alkoholkurve, was darauf zurückzuführen ist, daß das Bilirubin in Soda gelöst ist und die Alkohollösung dadurch einen geringen Zusatz von Alkalien enthält. Kurve IV, Abb. 6, endlich gibt das Absorptionsspektrum von Menschengalle wieder, die mittels einer Duodenalsonde entnommen wurde. Die Kurve ist dem alkalischen Bilirubinspektrum außerordentlich ähnlich.

Als *Ergänzung* zu diesem Kapitel geben wir noch die Kurve der Absorptionsspektren von *nativem Pferdeserum* mit seinem Alkoholextrakt (Kurve V und VI in Abb. 6) wieder. Die Kurve des Pferdeserums steigt von 700 600 $\mu\mu$ flach an, zeigt bei 580 $\mu\mu$ den ausgeprägten Knick des Hämoglobinstreifens. Der zweite Hämoglobinstreifen kommt durch die weitere starke Absorption nicht zum Ausdruck. Im blauen Spektralgebiet tritt das Bilirubinspektrum bis 440 $\mu\mu$ ausgeprägt

in Erscheinung. Das Absorptionsmaximum liegt, wie bei dem im Pferdeserum gelösten Bilirubin, bei 470 $\mu\mu$. Es muß die spezifische Art der Zusammensetzung des Pferdeserums sein, die die Linksverschiebung

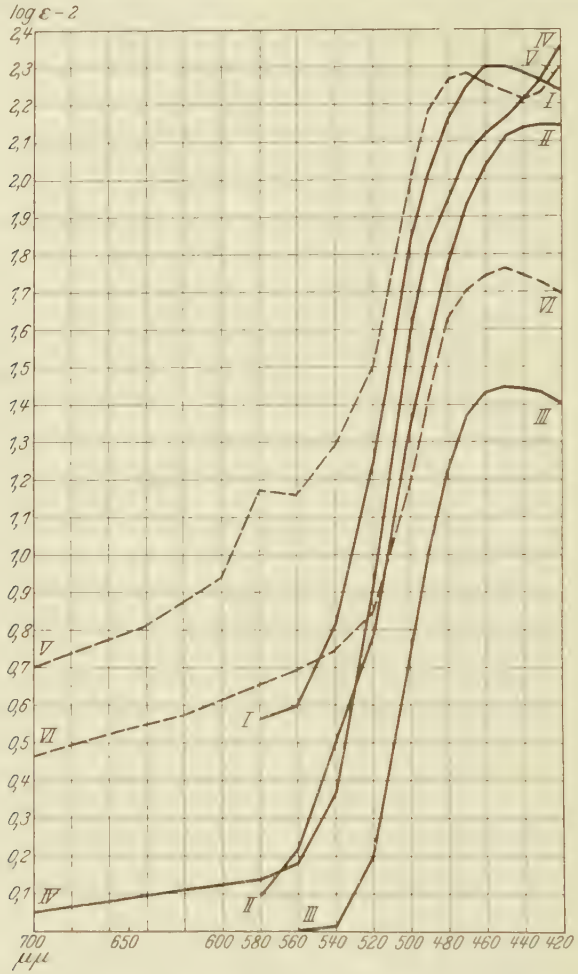

Abb. 6. Kurven I—III quantitative Spektren des Bilirubins. I Bilirubin in 10fach mit H_2O verdünntem Serum; II alkalisches Bilirubin in Aqua destillata; III dasselbe wie II + 2 Teile Alkohol; IV typische Farbkurve von Menschengalle; V typische Farbkurve von Pferdeserum; VI typische Farbkurve des Alkoholextrakts von V.

um 20 $\mu\mu$ gegenüber dem neutralen Bilirubinspektrum in Chloroform und Alkohol bedingt. Daß die Bilirubinkurve so deutlich ausgeprägt ist, ist wohl auf den hohen Bilirubingehalt von 1,82 mg-% Bilirubin in diesem Falle zurückzuführen. Die gelbe Farbe des Pferdeserums muß in der Hauptsache durch das Bilirubin bedingt sein, da die Licht-

auslöschung im Blau kaum größer ist als dem Bilirubingehalt entspricht. Der Anstieg von 440—420 $\mu\mu$ ist durch Hb und daneben durch einen weiteren Farbstoff bedingt, wie im nächsten Kapitel näher ausgeführt wird. Die Kurve des Alkoholextraktes des Pferdeserums zeigt einen der Bilirubin-Alkohollösung sehr ähnlichen Verlauf. Die Kurve besitzt ein umschriebenes Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 450 $\mu\mu$. Es läßt sich daraus schließen, daß die Gegenwart von Alkohol den Einfluß der eiweißfreien Fraktion des Pferdeserums auf das Bilirubinspektrum verdrängt; es ist ja auch doppelt so viel Alkohol wie Serum in dem Gemisch vorhanden.

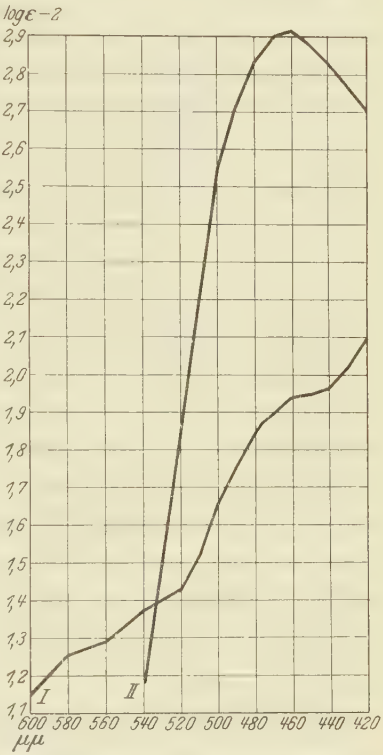

Abb. 7. I typische Farbkurve eines Normalserums; II typische Farbkurve des Bilirubins in Menschenserum.

Die quantitative spektrophotometrische Bilirubinbestimmung im Blutserum.

Aufbauend auf der Tatsache, daß das Bilirubin der Hauptfarbstoff des Blutserums sei und dessen Absorptionsspektrum wesentlich beherrsche, haben *Sheard, Baldes, Mann* und *Bollmann*[2] und *Magath* und *Sheard*[3] in Amerika, *P. Müller* und *L. Engel*[4] in Deutschland die Spektrophotometrie zur quantitativen Bilirubinbestimmung im Blutserum herangezogen. Die amerikanischen Autoren halten diese Methode für die genaueste Bilirubinbestimmung. Das wäre zweifellos richtig, wenn das Absorptionsspektrum des Bilirubins mit dem Spektrum des genuinen Serums völlig übereinstimmte. Wie Abb. 7 zeigt, ist das aber — entgegen der Ansicht der amerikanischen Autoren — nicht der Fall. Der Fehler, welcher die amerikanischen Autoren zu dieser Täuschung veranlaßte, wurde bereits eingangs erwähnt. Er liegt in der unzweckmäßigen Wahl der Ordinate ihrer Kurven begründet. Nur der Vergleich der „typischen Farbkurven", wie in Abb. 7, läßt den Unterschied deutlich erkennen. Er beweist, *daß neben dem Bilirubin noch andere Farbstoffe im Blutserum vorhanden sein müssen.* Einer davon, das Hämoglobin, wurde bereits erwähnt. Ein weiterer wird uns bei Besprechung des letzten Kurvenabschnittes von 440—420 $\mu\mu$ begegnen. Aus diesem Grunde haben wir auf eine genaue spektrophotometrische Bestimmung des Bilirubingehaltes im Blutserum

verzichtet. An ihre Stelle tritt die spektrophotometrische Farbmessung des Serums, wie sie schon vor mehreren Jahren von *Heilmeyer* und *Wappler*[4] in die klinische Medizin eingeführt wurde. Der Extinktionskoeffizient für das Spektralgebiet von 475 bis 450 $\mu\mu$, der durch Verwendung des Farbfilters S 47 im *Zeiß*schen Stufenphotometer bequem gemessen werden kann, ist ein sehr feines Maß für die Farbkonzentration des Blutserums, die im wesentlichen dem Bilirubingehalt des Serums parallel geht. Extinktionswerte (pro 1 cm Schicht) zwischen 0,5 –1,0 sind normal, darüber und darunter liegende pathologisch. Der Wert dieser Methode liegt neben ihrer außerordentlich einfachen Ausführung vor allem darin, daß man auch pathologische Farbstoffverminderung wie sie bei Nephritis, sekundären Anämien, Amyloidosen u. a. vorkommen, exakt feststellen kann.

3. *Der Spektralabschnitt von 440—420 $\mu\mu$.*

Aus Abb. 2 und 3 geht hervor, daß Hämoglobin sehr stark an dem Anstieg der Normalkurve von 440—420 $\mu\mu$ beteiligt ist. Bei dem fast hämoglobinfreien Serum (Kurve I, Abb. 2) verläuft die Kurve von 450 $\mu\mu$ an bis zum violetten Ende zu annähernd horizontal. Schon ein geringer Zusatz von Hämoglobin bewirkt einen Anstieg von 430 $\mu\mu$ an, wie Kurve II und III der Abb. 2 zeigen. Je größer der Zusatz von Hämoglobin ist, desto deutlicher tritt der Anstieg in Erscheinung und desto mehr verschwindet der Bilirubinbogen mit seinem Absorptionsmaximum bei 460 $\mu\mu$. Kurve VI, Abb. 2, mit dem höchsten Hämoglobinzusatz zeigt das sehr eindrucksvoll. Wie aus dem Verlauf der Absorptionskurve des reinen Hämoglobins hervorgeht (s. *Vles*[11]), strebt der Anstieg im blauen Spektralgebiet einem Maximum zu, das bereits jenseits unseres Meßbereiches bei 414 $\mu\mu$ liegt (dritter Hämoglobinstreifen der Spektroskopiker). Auf Abb. 3, Kurve II, ist deutlich zu sehen, wie durch die Ausfällung des Hämoglobins durch Alkohol der Anstieg im blauen Spektralabschnitt verschwindet und der Bilirubinbogen, von dem im hämolytischen Serum der Kurve I überhaupt nichts zu sehen ist, nun deutlich herauskommt. Bei den meisten Seren, bei denen wir auch die Absorptionsspektren der Alkoholextrakte aufnahmen, konnten wir diese Erscheinung beobachten.

Dennoch kann der Anstieg von 440 zu 420 $\mu\mu$ nicht nur auf Hämoglobin zurückgeführt werden. Die Kurven einiger Alkoholextrakte weisen denselben Anstieg auf, wie ihre Blutsera, wie man auf Abb. 8 deutlich erkennen kann. Um was für einen Farbstoff es sich hier handelt, läßt sich noch nicht sagen; es müßte dies Gegenstand einer besonderen Untersuchung sein. Jedenfalls ist der Farbstoff alkohollöslich und sieht gelb aus. Wir werden bei Besprechung des Carotinspektrums noch auf einen Farbstoff hinweisen, der möglicherweise hierfür in Frage kommt.

4. Der Spektralabschnitt von 700—600 μμ.

Als letztes ist noch der erste Teil der Normalserumkurve von 700 bis 600 μμ zu besprechen. Im allgemeinen ist der Verlauf im roten Spektralabschnitt geradlinig, verhältnismäßig flach ansteigend. Bei einigen Kurven verläuft dieser Teil hoch, wie beispielsweise bei Kurve II, Abb. 1, bei einigen tiefer. Diese Unterschiede sind durch geringfügige

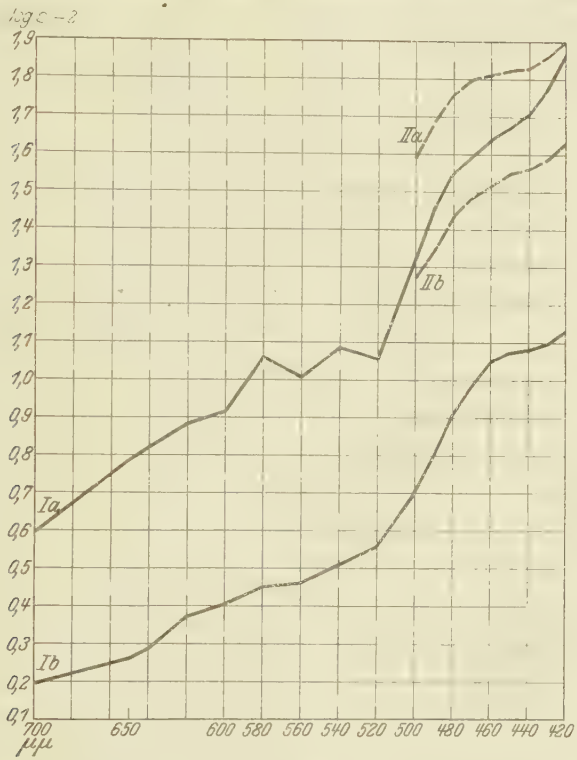

Abb. 8. Ia typische Farbkurve eines hämolytischen Normalserums; Ib des zugehörigen Alkoholextrakts; IIa Serumkurve; IIb Alkoholextraktkurve.

Trübungen bedingt, wie folgender Versuch beweist: Zu einem Normalserum wurde ein Tropfen Milch gefügt, und das Spektrum dieses durch künstliche Lipämie stark getrübten Serums aufgenommen. Kurve VI, Abb. 1, zeigt das Resultat. Der Verlauf dieser Kurve ist von 700—520 μμ ein ganz flacher und liegt wesentlich höher als die übrigen Kurven.

Kurve V zeigt als einzige eine flache Ausbiegung um 630 μμ herum: einige Tage später war diese Ausbiegung in dem Serum derselben Normalperson nicht mehr nachzuweisen. Es wurde nicht geklärt, welcher Farbstoff diese Erscheinung hervorrief. Wir werden jedoch weiter unten

bei Besprechung pathologischer Seren zeigen, daß *Hämatin* diese Veränderung der Farbkurve bewirken kann.

5. Lipochrome, ihr quantitatives Absorptionsspektrum in Alkohol, Petroläther und Serum.

Bei der bisherigen Betrachtung der Farbkurven der Normalsera konnte kein Hinweis auf die Anwesenheit von Lipochromen gefunden werden. Aus der Arbeit von *Hijmans van den Bergh* und *Snapper*[7] sowie anderer Autoren [12] geht aber einwandfrei hervor, daß an der Farbe des Blutserums auch Lipochrome beteiligt sind. Die Autoren fanden, daß der Gehalt an Lipochromen weitgehend von der Nahrung abhängig ist. Bei Normalen findet man deshalb nur geringe Mengen von Lipochromen, während bei Nephritikern und Diabetikern mit ihrem vorwiegend pflanzlichen Kostregime eine stärkere Vermehrung dieser Farbstoffe beobachtet wurde. Es schien uns deshalb wichtig, auch den Absorptionserscheinungen dieser Farbstoffe im Blutserum nachzugehen. Dazu war es notwendig, zunächst einmal das quantitative Absorptionsspektrum des Carotins in verschiedenen Lösungsmitteln aufzunehmen. Abb. 9 zeigt das Ergebnis in Form von typischen Farbkurven. Unsere Messungen stimmen ausgezeichnet mit den Untersuchungen von *Morton* und *Heilbronn* [13] überein. Auch das Carotin zeigt ähnlich dem Bilirubin einen steilen Aufstieg vom langwelligen zum kurzwelligen Gebiet. In letzterem finden sich drei kleine Maxima bei 480, 450 und 427 $\mu\mu$ für die alkoholische Lösung bzw. 474, 450 und 425 $\mu\mu$ für Petroläther, wobei die Lage des letzten Maximumpunktes nicht mit absoluter Sicherheit festgestellt werden konnte. Spektroskopisch können nur die ersten beiden Streifen gesehen werden*. Der dritte Streifen wurde erst durch die spektrophotometrischen Methoden entdeckt. Ein Luteinextrakt aus Eigelb mit Alkohol nach Angabe von *Schumm* [14] ergab ähnliche Werte wie die alkoholische Carotinlösung, wie Kurve III darstellt.

Wie beim Bilirubin, so erhob sich auch hier die Frage, wie sich das im Serum gelöste Carotin in bezug auf sein Absorptionsspektrum verhält. Zur Beantwortung dieser Frage wurde zu einem Normalserum tropfenweise eine alkoholische konzentrierte Carotinlösung unter ständigem Umschwenken zugefügt, bis ein deutlicher Unterschied der Färbung gegenüber dem Ausgangsserum wahrnehmbar war. Selbstverständlich durfte im ganzen nur soviel Alkohol zugetan werden, daß keine Ausfällung des Serumeiweißes eintrat. Die spektrophotometrische Messung wurde so vorgenommen, daß dem Carotinserum das durch dieselbe Menge Alkohol verdünnte Ausgangsserum gegengeschaltet wurde. Es muß noch bemerkt werden, daß die Messung infolge der großen Lichtabsorption des zugrundeliegenden Ausgangsserums eine sehr unsichere ist, so daß kleine Diffe-

* Siehe *Schumm* [14].

renzen in der Kurvenform von 445 $\mu\mu$ an nicht gewertet werden dürfen. Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet erscheint das Absorptionsspektrum

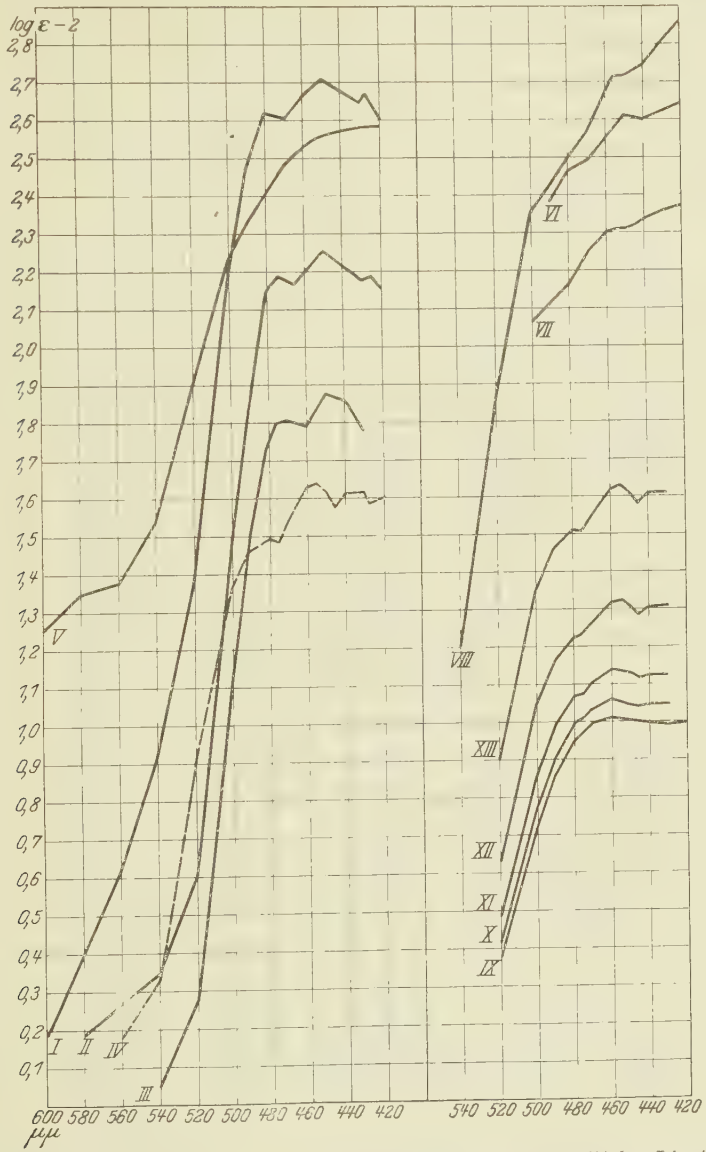

Abb. 9. Typische Farbkurven des Carotins in verschiedenen Lösungsmitteln. I in Alkohol; II in Petroläther; III alkoholische Eigelblösung; IV alkoholische Carotinlösung zu Serum gefügt und gegen den Alkohol-Serumstandard gemessen; V alkoholische Carotinlösung + Serum gegen Wasser gemessen; VI alkoholische Carotinlösung nach 5 Tagen (offen gestanden); VII alkoholische Serumcarotinlösung gegen Serum nach mehreren Stunden; VIII 5 Tage alte alkoholische Serumcarotinlösung gegen Serum gemessen.

des Carotins im Serum (Abb. 9, Kurve IV) dem in Alkohol sehr ähnlich. Das Hauptmaximum erscheint allerdings um 5 $\mu\mu$ nach links verschoben (455 $\mu\mu$). Um zu prüfen, inwieweit die charakteristischen Absorptionserscheinungen des Carotins auch bei Gegenwart der anderen Serumfarbstoffe, vor allem Bilirubin, in Erscheinung treten, wurde noch die typische Farbkurve des Carotinserums gegen Wasser aufgenommen. Wie Kurve V, Abb. 9, zeigt, findet sich nicht die geringste Andeutung eines Absorptionsstreifens trotz Zufügens einer stark konzentrierten alkoholischen Carotinlösung.

Um diese merkwürdige Tatsache näher zu untersuchen, wurde der Einfluß der Hinzufügung von Carotin zu genuinem Normalserum auf die typische Farbkurve rechnerisch zu ermitteln gesucht. Es wurde dabei in derselben Weise vorgegangen, wie es eingangs bei unseren Hämoglobinversuchen geschildert wurde. Auf die typische Farbkurve eines Normalserums wurde unter Berücksichtigung der Mischungsverhältnisse die alkoholische Carotin-Serumkurve, Abb. 9, Kurve IV, addiert. Dabei ergaben sich unter Zugrundelegung steigender Carotinmengen die Kurven IX - XIII der Abb. 9. Bei dieser Berechnung ist selbstverständlich die Annahme gemacht, daß bei der Zufügung der alkoholischen Carotin-Serumlösung zum Normalserum keine chemischen Änderungen auftreten. Wie die Abbildung zeigt, tritt das typische Spektrum des Carotins im Serum erst dann in Erscheinung, wenn das zugefügte Carotin 50% und mehr von der Lichtextinktion der Mischung bei Wellenlänge 460 $\mu\mu$ beträgt. Jedoch lassen auch die Kurven, bei denen der Carotinanteil bedeutend weniger als 50% der gesamten Lichtextinktion bei 460 $\mu\mu$ ausmacht, bereits eine Andeutung des Carotinspektrums in Form eines Knicks bei 460 $\mu\mu$ erkennen. Schon bei einem Carotingehalt von 10% auf die Lichtextinktion bei 460 $\mu\mu$ bezogen, läßt sich dieser Knick erkennen.

Diese ausgeführten rechnerischen Überlegungen sagen uns also, daß ein schon relativ sehr geringer Carotingehalt in der typischen Farbkurve erkennbar sein müßte, vorausgesetzt, daß das Carotin im Serum unverändert bleibt. Wenn wir also bei unserem Versuch, den Kurve V, Abb. 9, demonstriert, keine Andeutung in der Farbkurve des zugefügten Carotins erkennen, so weist das mit Bestimmtheit darauf hin, daß das zugefügte Carotin sich sehr rasch im Serum verändert hat. Ob diese Veränderung mit der Herstellung der Serum-Carotinlösung (Lösung zuerst in Alkohol, dann Zufügung der alkoholischen Lösung zu Serum) oder mit anderen Momenten zusammenhängt, vermögen wird vorerst nicht zu entscheiden.

Die Veränderung der Carotinlösung an der Luft bei längerem Stehen.

Die leichte Veränderlichkeit der Lipochrome unter Einwirkung von Luftsauerstoff ist bekannt, und die oben geschilderten Versuche haben

das mit Deutlichkeit gezeigt. Bei längerem Stehen an Luft und Licht verlieren sie allmählich ihre Farbe. Es schien uns interessant, die ersten Veränderungen spektrophotometrisch zu erfassen. Zu diesem Zwecke wurden typische Farbkurven alkoholischer Carotinlösungen, die 5 Tage im offenen Reagensglas gestanden hatten, aufgenommen. Das Ergebnis zeigt Kurve VI, Abb. 9. Man sieht, daß die charakteristischen Maxima verloren gehen. Das erste und zweite Maximum ist nurmehr durch einen leichten Knick angedeutet, während die Endabsorption gegen das kleinwellige Gebiet hin langsam zunimmt. Noch stärker zeigt sich diese Erscheinung bei einer alkoholischen Carotin-Serumlösung. Schon wenige Stunden nach Herstellung der Lösung mit frisch aufgelöstem Carotin ist nur noch das Hauptmaximum (Kurve VII) in Form eines kleinen Knickes bei 455 $\mu\mu$ angedeutet, die Endabsorption nimmt ungefähr in demselben Maße zu wie in der fünf Tage gestandenen alkoholischen Carotinlösung. Noch stärker wird die Endabsorption, wenn diese fünf Tage alte Carotinlösung zu einem Serum gefügt wird, während der Knick bei 455 $\mu\mu$ in gleicher Deutlichkeit vorhanden ist (Kurve VIII). Diese Erscheinungen beweisen nicht nur die Veränderlichkeit der Lipochrome an Luft und Licht, sondern noch eine viel schnellere Einwirkung und Veränderung durch die Gegenwart von Serum. Diese Tatsachen erscheinen uns im Hinblick auf den unbekannten oben erwähnten gelben Farbstoff, der in vielen Normalseren vorkommt, bedeutungsvoll. Es wäre immerhin der Untersuchung wert, ob nicht die zunehmende Endabsorption, die wir bei manchen Seren und deren Alkoholextrakten beobachten, durch diesen veränderten Carotinfarbstoff hervorgerufen ist.

II. Pathologische Kurven.

Zu den Untersuchungen über die Serumfarbstoffe wurden auch pathologisch veränderte Blutsera herangezogen mit Bevorzugung solcher, bei denen der Gallenfarbstoff vermehrt auftritt (perniziöse Anämie und Ikterus), bei denen die Lipochrome durch besondere Diät vermehrt sind, unter gleichzeitiger Verminderung des Bilirubins (Diabetes, Nephritis) und bei denen andere pathologische Farbstoffe vorkommen (Vergiftungen).

1. Anaemia perniciosa.

Betrachten wir zunächst einige Beispiele von Seren mit perniziöser Anämie (Abb. 10), so fällt in ihrem Gesamtverlauf im Gegensatz zu den Normalserumkurven besonders der Teil des blauen Spektralabschnitts auf (Kurve I, II und III). Die Ausbildung eines Bilirubinbogens mit einem Absorptionsmaximum bei 450 $\mu\mu$ kommt hier deutlicher heraus. Die Kurve verläuft von 440 $\mu\mu$ an mehr oder weniger horizontal, zeigt jedenfalls nicht den steilen Anstieg von 440 —420 $\mu\mu$ wie die Normalkurve. Der Grund hierfür ist in zweierlei Ursachen zu suchen: 1. Ist der Bilirubingehalt durch den vermehrten Zerfall der roten Blutkörperchen

erhöht, was zahlenmäßig durch die vermehrte Lichtauslöschung bei 450 $\mu\mu$ (hier 1,4, 1,7 und 1,8 gegenüber normal 0,8—1,0) und den

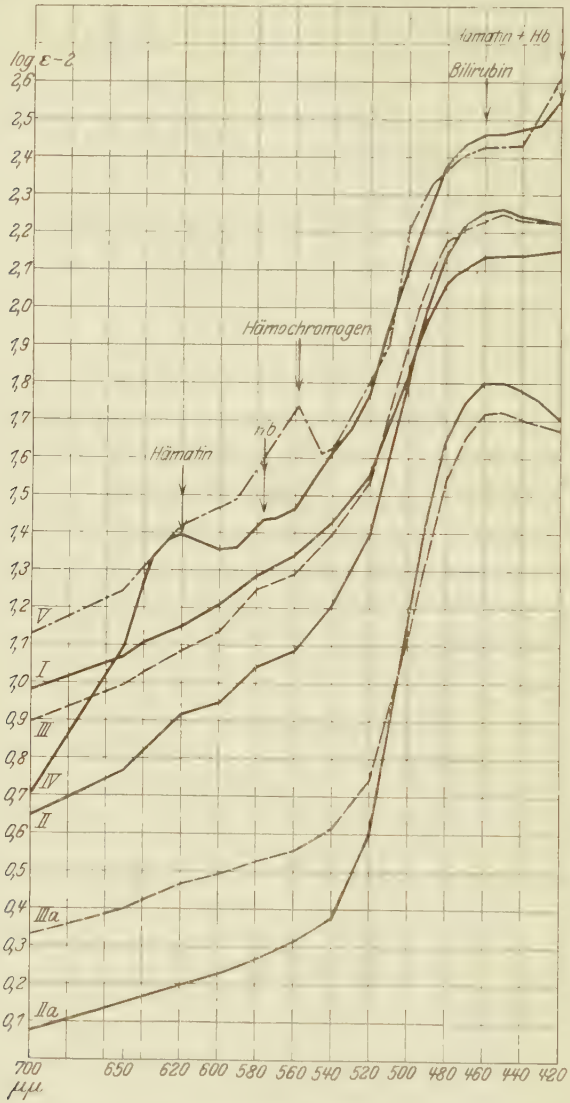

Abb. 10. Typische Farbkurven pathologischer Seren. I—III Perniciosaseren; IIa und IIIa die zugehörigen Alkoholextrakte; IV „Hämatinikterus" bei Perniciosa; V Serum IV durch $Na_2S_2O_4$ reduziert.

vermehrten Bilirubingehalt (mehr als 1 mg-% ausgedrückt wird. 2. Sind zufällig (?) diese drei Sera fast hämolysefrei, so daß kein Anstieg zum

dritten Gipfel des Hämoglobins erfolgen kann. Noch deutlicher kommt aber das Bilirubinspektrum in den Alkoholextrakten der Blutsera von perniziöser Anämie zum Ausdruck. Im Alkoholextrakt ist fast nur Bilirubin enthalten, während andere Farbstoffe, die im unbehandelten Serum den Bilirubinbogen verdecken, offenbar mit dem Eiweißpräcipitat ausfallen. Die Alkoholextrakte der Normalsera zeigen dagegen meist einen horizontalen oder nur ganz wenig, von 450 $\mu\mu$ an, abfallenden Verlauf.

Zwei Perniciosakurven verdienen ein besonderes Interesse (Kurve II und IV). Sie lassen eine deutliche Ausbiegung mit einem Maximum bei 620 $\mu\mu$ erkennen. Besonders schön tritt diese Erscheinung in Kurve IV zutage. Diese Kurve zeigt außerdem im Gegensatz zu den anderen Perniciosakurven einen deutlichen Anstieg von 440—420 $\mu\mu$. Um den Farbstoff, der diesen Erscheinungen zugrunde liegt, näher zu definieren, wurde das Serum der Kurve IV mit einer Messerspitze voll $Na_2S_2O_4$ versetzt und nach der Reduktion nochmals eine Farbkurve aufgenommen. Das Absorptionsmaximum bei 620 $\mu\mu$ ist jetzt nahezu verschwunden, wie Kurve V zeigt, dagegen ist jetzt ein deutlich ausgesprochenes Maximum bei 558 $\mu\mu$ getreten (Streifen des Hämochromogens). Auf Grund dieser Befunde kann es keinem Zweifel unterliegen, daß der im Serum dieses Patienten neben dem Bilirubin vorhandene Farbstoff Hämatin ist. In ganz eigenartiger Weise zeigt die hier vorliegende Farbkurve den Vorgang des Hämoglobinzerfalls bei der *Biermer*schen Krankheit. Neben dem Hämoglobin sehen wir das nächste Spaltprodukt, das Hämatin, in großer Menge vertreten und als letztes Abbauprodukt das Bilirubin. Die sämtlichen drei Farbstoffe konnten durch die Aufnahme einer einzigen Farbkurve des Serums nachgewiesen werden. Der Hämatingehalt ist in diesem letzteren Fall so vorherrschend, daß die Farbe des Serums schon äußerlich verändert ist. An Stelle der goldgelben Farbe der übrigen Perniciosaseren fand sich hier ein braungelber Farbton, der auch die Hautfarbe des Patienten beherrschte. Diese zuerst von *Schumm*, *Bingold*, *Schottmüller* und *Hegler* beschriebenen Fälle* von ausgesprochenem „Hämatinikterus" sind jedoch auf Grund unserer Untersuchungen ziemlich selten. Jedenfalls muß man diesen Hämatinikterus bei perniziöser Anämie, bei dem Hämatin den Hauptfarbstoff des Blutserums darstellt, als etwas Besonderes auffassen. Vermutlich handelt es sich in diesen Fällen um eine besondere Störung im Abbau des Blutfarbstoffs.

2. Hepatischer Ikterus.

Die typischen Farbkurven von Verschlußikterusseren laufen, wie Kurve I und IV, Abb. 11, zeigt, ganz ähnlich wie die Perniciosakurven. Auch bei ihnen tritt im Gegensatz zu den Normalkurven der Bilirubinbogen viel deutlicher hervor. Es muß aber betont werden, daß trotz

* Siehe darüber die zusammenfassende Darstellung von *R. Bingold* in Fol. haemat. (Lpz.) **42**, H. 2 (1930).

der enormen Bilirubinvermehrung in diesen Fällen die Serumkurven keineswegs den Kurven von reinem, im Serum gelösten Bilirubin gleichen. Es müssen also neben dem Bilirubin noch ein oder mehrere Farbstoffe

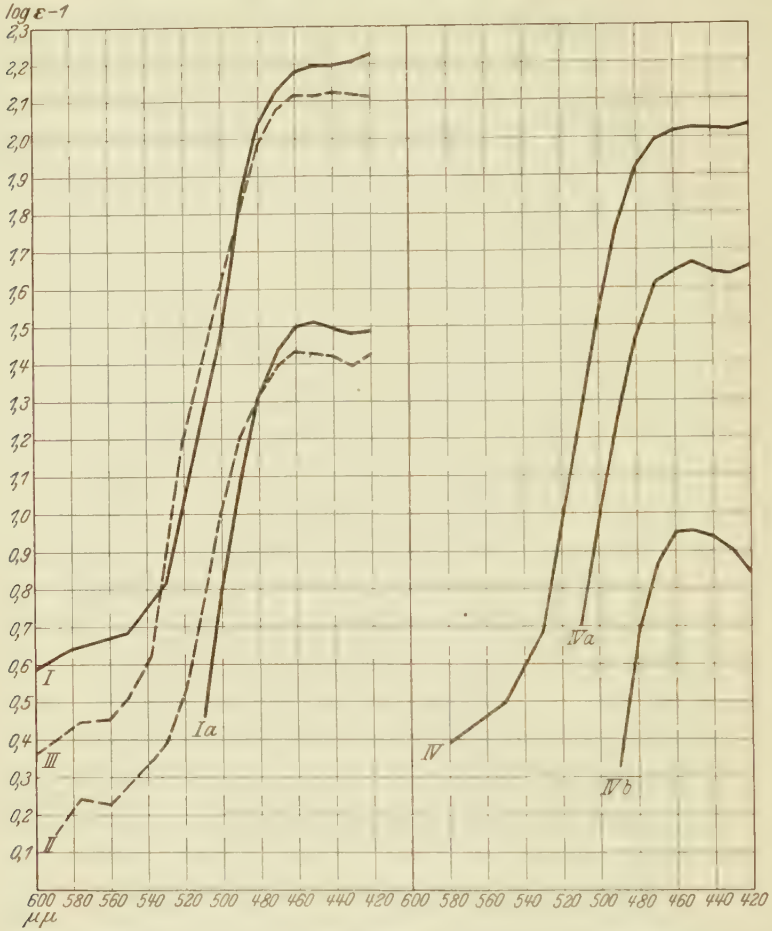

Abb. 11. Typische Farbkurven von Ikterusseren. I und IV Ikteruskatarrh; Ia und IVa zugehörige Alkoholextrakte; IVb Chloroformextrakt zu IV; II und III hämolytischer Ikterus.

vorhanden sein, welche das Zustandekommen des reinen Bilirubinspektrums verhindern. Daß diese Farbstoffe alkohollöslich sind, beweisen die Kurven der Alkoholextrakte (Kurve Ia und IVa), welche in ihrem letzten Abschnitt von 430—420 $\mu\mu$ sogar einen geringen Anstieg erkennen lassen. Dagegen zeigt das Absorptionsspektrum des Chloroformextraktes eines Ikterusserums (Kurve IVb) den Verlauf einer reinen Bilirubin-Chloroformlösung.

3. Hämolytischer Ikterus.

Auch die Farbkurven von zwei Fällen von hämolytischem Ikterus*, Kurve II und III, Abb. 11, zeigen denselben Verlauf wie die Kurven von Stauungsikterus bzw. perniziöser Anämie. Dabei gab Serum II nur die indirekte, Serum III die direkte Bilirubinreaktion. Es sind diese Beobachtungen deshalb interessant, weil sie einen Hinweis dafür

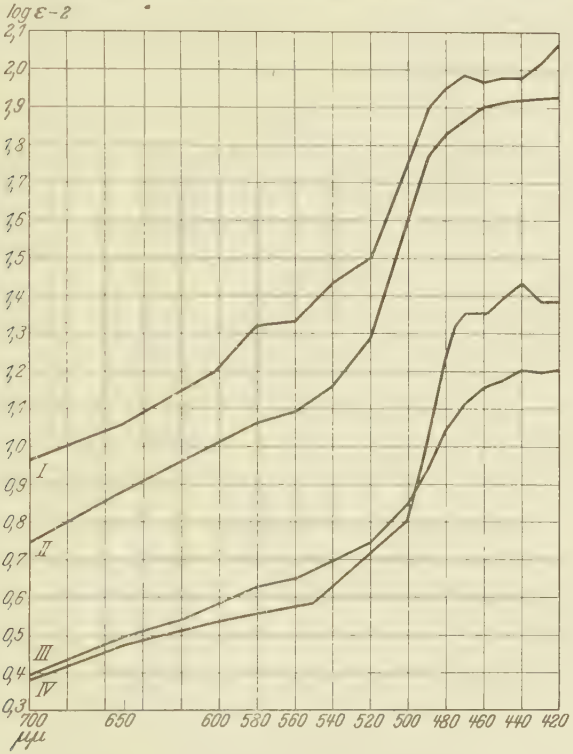

Abb. 12. Typische Farbkurven von Diabetes- und Nephritisseren. I Diabetesserum; II Nephritisserum; III Alkoholextrakt von II; IV Petrolätherextrakt von II.

geben, daß das Spektrum des direkt (mit Diazoreagens) reagierenden Bilirubins sich offenbar in keiner Weise von dem des indirekt reagierenden Bilirubins unterscheidet, ein Befund, den *Heilmeyer* und *Krebs* [12] schon für den Azofarbstoff der beiden Bilirubine erhoben haben.

4. Diabetes mellitus.

Die typischen Farbkurven von Diabetikerseren zeigten vielfach einen normalen Verlauf. Eine Besonderheit bot nur Kurve I, Abb. 12.

* Das Serum des einen davon verdanke ich dem liebenswürdigen Entgegenkommen von Herrn Dr. *Mauke* an der Leipziger Medizinischen Universitätsklinik, wofür auch an dieser Stelle gedankt sei.

An Stelle des sonst gleichmäßig verlaufenden Bilirubinbogens sind zwei kleine Zacken vorhanden, die auch bei der Kontrollmessung 12 Stunden später erhalten wurden. Außerdem nimmt die Kurve von 440 –420 $\mu\mu$ einen außerordentlich steilen Verlauf, obwohl nur minimale Spuren von Hämoglobin vorhanden sind. Dies sowie die Lage der beiden Zacken bei 470 bzw. 450 $\mu\mu$ läßt mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Anwesenheit von Lipochromen bzw. deren Oxydationsprodukten schließen, von denen wir früher gezeigt haben, daß sie eine gegen 420 $\mu\mu$ stark ansteigende Absorption besitzen.

5. Nephritis.

Auch unter den Nephritikerseren verdient nur eines besonderer Erwähnung, bei dem wir durch den Umstand, daß wir durch einen Aderlaß eine größere Menge Blut zur Verfügung hatten, besondere Untersuchungen vornehmen konnten. Die Kurve des Serums (Kurve II, Abb. 12) nimmt einen verhältnismäßig flachen Verlauf, was auf die Lipämie, die für Nephritis durchaus typisch ist, zurückzuführen ist. Daß die Kurve trotz Nichtvorhandenseins von Hämoglobin im blauen Spektralabschnitt noch etwas ansteigt, weist auf jenen gelben Farbstoff hin, der möglicherweise ein Lipochromabbauprodukt ist. Auch die Kurve des Alkoholextraktes, Kurve III, Abb. 12, zeigt nach einem kleinen Knick bei 440 $\mu\mu$ noch einen geringen Anstieg von 430–420 $\mu\mu$. Da uns eine reichliche Menge Serum zur Verfügung stand, machten wir den Versuch nach Angabe von *Boeck* und *Wallace*[17], die eventuell vorhandenen Lipochrome mit Petroläther zu extrahieren. Dabei wurde ein Teil Serum mit einem Teil Alkohol und einem Teil Petroläther ausgeschüttelt und zentrifugiert. Dadurch soll nach Angabe der amerikanischen Verfasser das Bilirubin in den Alkohol übergehen, während der Petroläther die Lipochrome enthält. Da der überstehende Petroläther nur ganz schwach gefärbt war, wurde er auf wenige Kubikzentimeter eingedampft und dann das Absorptionsspektrum davon aufgenommen. Wie Kurve IV, Abb. 12, zeigt, finden sich jetzt zwei deutliche Absorptionsstreifen bei 470 und 440 $\mu\mu$, welch letzterer Streifen dem Knick bei 440 $\mu\mu$ im Alkoholextrakt entspricht. Diese beiden Absorptionsstreifen sind zweifellos auf Lipochrome zu beziehen. Da wir damals den dritten Streifen noch nicht gefunden hatten, haben wir diese Stelle nicht gemessen; es ist aber zu vermuten, daß er wie die beiden andern Streifen um 10 $\mu\mu$ nach rechts verschoben ist.

6. Methämoglobinikterus.

Ein Fall von Methämoglobinikterus verdient noch besondere Beachtung. Es handelte sich um eine Patientin aus der hiesigen Universitäts-Frauenklinik mit Abort im 7. Monat. Die Frau kam mit schweren Vergiftungserscheinungen in die Klinik. Ein krimineller Eingriff konnte

mit größter Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, so daß angenommen werden muß, daß es sich um eine besondere Form einer

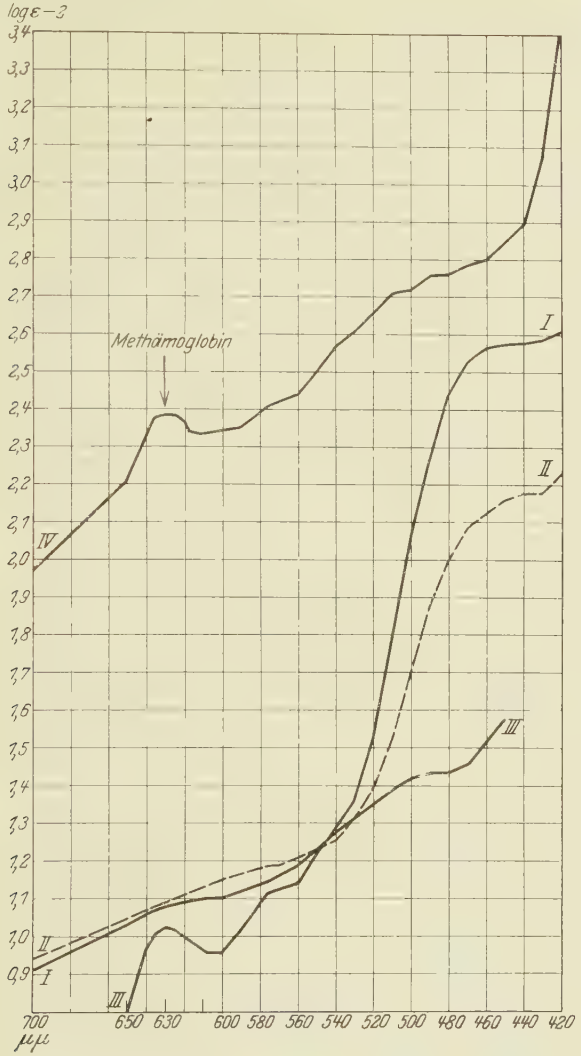

Abb. 13. Typische Farbkurven des Serums und Harns eines Methämoglobinikterus. I Serum des Falles am 2. Tag nach Beginn der Vergiftungserscheinungen; II Serum am 7. Tag; III Harn des Falles am 2. Tag; IV Serum des Fetus sofort nach Beendigung des Abortus (2. Tag der Vergiftung).

Schwangerschaftstoxikose gehandelt hat. Blut und Harn der Patientin sowie das Blut des Fetus wurde uns freundlichst zur Untersuchung überlassen. Bei der Untersuchung achteten wir besonders auf Absorptionsstreifen

pathologischer Farbstoffe, insbesondere auf Methämoglobin, da dieser Farbstoff oft bei Toxikosen im Blut vorkommt. Das Serum der Patientin war sehr dunkel, der Bilirubingehalt betrug 5,35 mg-% . Das Serum zeigte jedoch ein Absorptionsspektrum (Kurve I, Abb. 13), das nicht mit Sicherheit auf Methämoglobin, noch auf sonst einen fremden Farbstoff schließen ließ. Es zeigt nur eine ganz geringe Ausbiegung zwischen 650 und 600 $\mu\mu$. Bei Untersuchung des Harns und des Fetalserums aber (Kurve III und IV) fanden sich die typischen Anzeichen für saures Methämoglobin, nämlich ein deutlicher Streifen bei 630 $\mu\mu$ und mehrere kleine Knicke, die den schmaleren Absorptionsstreifen bei 576, 538 und 490 $\mu\mu$ entsprechen. Besonders deutlich sind diese Stellen im Fetalserum ausgeprägt. Dieser sichere Nachweis von Methämoglobin sowohl im Harn der Patientin wie im Blut des Fetus machen es sehr wahrscheinlich, daß auch die geringe Ausbiegung bei 630 $\mu\mu$ im Blut der Mutter (Kurve I) durch Methämoglobin hervorgerufen ist, um so mehr, als die fünf Tage später nach Ablauf der Vergiftungserscheinungen aufgenommene Kurve (Kurve II) diese Ausbiegung nicht mehr zeigt. Mit den üblichen spektroskopischen Methoden war im Blutserum der Mutter keine Spur von Methämoglobin nachzuweisen, wiederum ein Beweis für die Überlegenheit der spektrophotometrischen Technik.

Zusammenfassung.

Von normalen und pathologischen Blutseren sowie von Pferdeserum wurden mit dem Spektrophotometer von *König* und *Martens* typische Farbkurven aufgenommen, deren Form unabhängig von Konzentration und Schichtdicke nur durch die Natur des vorliegenden Farbstoffes bzw. Farbstoffgemisches bedingt ist. Dabei ergab sich folgendes: Der Hauptfarbstoff, der dem normalen wie auch den meisten pathologischen Seren die gelbe Farbe verleiht, ist das Bilirubin, wie aus dem charakteristischen Absorptionsverlauf von 520—440 $\mu\mu$ mit Sicherheit erkannt werden kann. Interessanterweise zeigt das Bilirubin im Blutserum ein Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 460 $\mu\mu$, das dem in Chloroform und Alkohol ähnlich ist, von dem Spektrum einer alkalischen, bzw. Bilirubin-Phosphatpufferlösung von $p_H = 7{,}4$ und einer Bilirubin-Ringerlösung jedoch deutlich verschieden ist. Das Spektrum des im Blutserum nach Injektion von Aqua dest. auftretenden Bilirubins ist mit einer künstlich hergestellten Serum-Bilirubinlösung identisch. In Pferdeserum gelöstes Bilirubin zeigt ein gegenüber in Menschenserum gelöstes ein um 10 $\mu\mu$ nach links verschobenes Absorptionsband.

Das Bilirubin ist nicht der einzige Farbstoff im Serum. Fast in allen Seren finden sich Spuren von Hämoglobin, von dem nicht bewiesen werden kann, ob es schon im zirkulierenden Blut enthalten ist, oder ob die Hämolyse erst durch die Serumgewinnung entstanden ist.

Auch mit aller Vorsicht gewonnenes Blutserum war nicht hämoglobinfrei zu erhalten.

Im kurzwelligen Teil des Spektrums tritt von 440 $\mu\mu$ an eine stark zunehmende Absorption in vielen Seren auf, die nicht auf Bilirubin beruhen kann. Diese Absorptionszunahme wird zum Teil durch Hämoglobin, zum Teil auch durch einen noch unbekannten gelben Farbstoff verursacht.

Ein sicherer Nachweis für Hämatin im normalen Serum konnte nicht erbracht werden. Eine ganz schwere Hämatinämie fand sich bei einem Fall von perniziöser Anämie. Gleichzeitig war dabei die Bilirubinkonzentration ganz bedeutend vermehrt. Bei einer schweren Schwangerschaftstoxikose konnte im Serum des Fetus wie der Mutter Methämoglobin nachgewiesen werden, das im Serum in seiner sauren Form vorkommt.

Neben diesen Hämoglobinabkömmlingen konnten auch die karotinoiden Farbstoffe an ihrer charakteristischen Absorptionskurve im Serum erkannt werden. Versetzt man einen Teil Blutserum zu einem Teil mit Alkohol und zu einem Teil mit Petroläther, so ergibt der Petroläther fast das reine Spektrum der Lipochrome, der Alkoholanteil das des Bilirubins. Diese Methode gibt also ausgezeichnet über die Konzentrationsverhältnisse dieser Farbstoffe im Serum Auskunft. Alkohol-, Petroläther- und Serumcarotinlösungen zeigen drei deutliche Maxima, von denen bisher nur zwei spektroskopisch nachweisbar waren.

Die Aufstellung einer typischen Farbkurve des Blutserums erwies sich bei vielen klinischen Fällen als eine ausgezeichnete Methode, um mit einem Blick die Farbstoffverhältnisse des Serums in qualitativer und auch in quantitativer Hinsicht zu überschauen. Sie ist der einfachen Spektroskopie bedeutend überlegen.

Literaturverzeichnis.

[1] *Vierordt, Karl:* Die quantitative Spektralanalyse. Tübingen 1876. — [2] *Sheard, Ch., Baldes, Mann, Bollmann:* Amer. J. Physiol. **76**, 577—585 (1926). — [3] *Magath* u. *Sheard:* Arch. int. Med. **39**, 214—225 (1927). — [4] *Heilmeyer* u. *Wappler:* Z. exper. Med. **63**, 630 (1928). — [5] *Müller, Pius* u. *L. Engel:* Verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1931**, 393. — [6] *Heilmeyer, L.:* Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 5, I. — [7] *Hijmans van den Bergh* u. *Snapper:* Die Farbstoffe im Blutserum. Dtsch. Arch. klin. Med. **110**, 540 (1913). — [8] *Hijmans van den Bergh:* Der Gallenfarbstoff im Blut. Leyden 1918. — [9] *Heilmeyer:* Biochem. Z. **232**, 229 (1931). — [10] Über die Methode s. *W. Graubner:* Z exper. Med **63**, 527 (1928). — [11] *Vlès, Fr.:* Notes sur les constantes optiques des Hémoglobines. Arch. Physique biol. **1**, Nr 1, 1. — [12] *Hijmans van den Bergh , P. Müller* u. *J. Broekmeyer:* Biochem. Z. **108**, 279—303 (1920). — [13] *Morton* u. *Heilbronn:* Biochemic. J. **24**, Nr 4, 870—873 (1930). — [14] *Schumm:* Die spektrochemische Analyse natürlicher organischer Farbstoffe. Jena 1927. — [15] *Bingold:* Kongr.verh. dtsch. Ges. inn. Med. **1922**. S. auch *Schumm* l. c. — [16] *Heilmeyer* u. *Krebs:* Biochem. Z. **223**, 352—364 (1930). — [17] *Boeck* and *Wallace:* J. Labor. a. clin. Med. **14**, 1129 (1929). Zit. nach Kongreßzbl. inn. Med. **55**, 598 (1929). — [18] *Müller, P.* u. *L. Engel:* Hoppe-Seylers Z. **199**, 117 (1931). [19] *Müller, P.* u. *L. Engel:* Hoppe-Seylers Z. **200**, 145 (1931).

Lebenslauf.

Ich bin am 13. November 1907 in Stettin geboren als die Tochter des Versicherungsdirektors Paul Toop und seiner Ehefrau Lilly geb. Weißflog. In Stettin besuchte ich das Lyzeum und Oberlyzeum und erhielt 1927 das Reifezeugnis. Darauf studierte ich Musikwissenschaften und besuchte die Hochschule für Leibesübungen in Berlin für ein Semester. Im Wintersemester 1927/28 begann ich mit dem medizinischen Studium in Jena und legte dort die ärztliche Vorprüfung 1930 ab. Dann studierte ich weiter in Wien und wieder in Jena und bestand im Juli 1933 das medizinische Staatsexamen. Neben dem medizinischen Studium habe ich mich noch mit Psychologie befaßt. Meine Medizinalpraktikantenzeit verbrachte ich an der Universitäts-Hautklinik und Medizinischen Poliklinik in Jena.

Helga Toop.